

PATENT  
ATTORNEY DOCKET NO. 05032-00013

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:	)	
	)	
Wouter L.J. Hinrichs and Henderik W. Frijlink	)	Examiner: James M. Spear
	)	
Serial No.: 10/007,800	)	Art Unit: 1615
	)	
Filed: December 7, 2001	)	
	)	
Title: STABILIZER FOR PHARMACONS	)	

Commissioner for Patents  
Mail Stop Issue Fee  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Mailing Date of Notice of Allowance: December 19, 2003  
Confirmation No.: 1838

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENTS

Applicants submit herewith certified copies of PCT Patent Application No. PCT/NL00/00405, and of Netherlands Patent Application No. 1012300, from which the above-referenced U.S. patent application claims priority. Please apply any other charges or any credits to Deposit Account No. 19-0733.

Respectfully submitted,

Dated: March 4, 2004

John P. Iwanicki, Reg. No. 34,628  
BANNER & WITCOFF, LTD.  
28 State Street, 28th Floor  
Boston, MA 02109  
(617) 720-9600

KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN

Bureau voor de Industriële Eigendom



This is to declare that in the Netherlands on June 13, 2000 under No. PCT/NL00/00405,  
in the name of:

**RIJKSUNIVERSITEIT GRONINGEN**

in Groningen and

**Wouter Leonardus Joseph HINRICHS**

in Groningen and

**Henderik Willem FRIJLINK**

in Eelde

an international patent application was filed for:

"Stabilisator voor farmaca",

("Stabilizer for pharmacons"),

that a right of priority was claimed based on patent application 1012300 filed on June 11, 1999 in

The Netherlands and that the documents attached hereto correspond with the originally filed documents.

Rijswijk, January 27, 2004

In the name of the president of the Netherlands Industrial Property Office

A stylized handwritten signature in black ink, consisting of a large, flowing 'M' followed by a horizontal line.

Mrs. M.M. Enhus

Titel: Stabilisator voor farmaca

De uitvinding heeft betrekking op een stabilisator voor farmaca, alsmede op een werkwijze om een farmacon te stabiliseren met genoemde stabilisator.

Door de ontwikkelingen in de biotechnologie hebben  
5 we de beschikking over een steeds grotere variëteit aan therapeutische eiwitten en peptiden. Het is te verwachten dat de toepassing van deze eiwitten en peptiden in de geneeskunde in de toekomst sterk zal stijgen.

Bij de productie worden therapeutische eiwitten en  
10 peptiden als waterige oplossingen verkregen. Het probleem is dat eiwitten en peptiden in oplossing doorgaans niet stabiel zijn. De biologische activiteit van de eiwitten en peptiden gaat hierdoor geleidelijk aan verloren waardoor de shelf-life van deze producten beperkt is. Verschillende  
15 chemische en fysische mechanismen zijn verantwoordelijk voor de afname van de activiteit. Chemische mechanismen zijn onder andere hydrolyse, deaminering, oxidatie, racemisatie en disulfide uitwisseling. Fysische mechanismen zijn onder andere aggregatie, gelering, denaturatie en  
20 adsorptie.

Uit bovenstaande valt af te leiden dat de afname van de activiteit met name is toe te schrijven aan de waterige omgeving van het eiwit of peptide. Met andere woorden, als het product in droge vorm zou kunnen worden verkregen, dan  
25 zou de shelf-life van het product verlengd worden. Het eiwit of peptide kan in droge vorm verkregen worden door bijvoorbeeld vriesdrogen, vacuümdrogen of sproeidrogen. Echter tijdens het droogproces staat het eiwit of peptide bloot aan sterke mechanische krachten (bijvoorbeeld tijdens  
30 het bevriezen van een oplossing als voorbereiding op vriesdrogen) waardoor eveneens schade aan het eiwit of peptide wordt toegebracht. Deze schade kan worden voorkomen door een stabiliserende hulpstof aan de oplossing toe te voegen. Met de juiste keuze van de hulpstof en de juiste

droogprocedure zal de hulpstof het product ook in droge vorm stabiliseren waardoor de shelf-life nog verder verlengd wordt.

5 Niet alleen therapeutische eiwitten en peptiden maar ook veel andere farmaca zijn instabiel. Om vergelijkbare redenen als hierboven is vermeld, kan de shelf-life verlengd worden door het product te drogen in aanwezigheid van een geschikte hulpstof.

10 De meeste farmaca worden verwerkt tot niet-intraveneuze toedieningsvormen zoals tabletten, capsules, zetpillen, lozenges, dermatica en suspensies voor subcutane of intramusculaire injecties. Om een adequate biologische beschikbaarheid te behalen is het noodzakelijk dat het geneesmiddel uiteindelijk in opgeloste vorm aan een  
15 adsorptiemembraan beschikbaar komt. Veel farmaca zijn echter slecht oplosbaar in waterig milieu. Hierdoor is de oplossnelheid doorgaans laag hetgeen er toe leidt dat de biologische beschikbaarheid ook laag is. Door de keuze van een geschikte hulpstof kan de oplossnelheid en daarmee de  
20 biologische beschikbaarheid verhoogd worden.

De uitvinding beoogt nu een hulpstof te verschaffen die gebruikt kan worden voor het stabiliseren van gevoelige farmaca. Deze groep van gevoelige farmaca strekt zich niet alleen uit tot eiwitten en (poly)peptiden, maar tevens tot  
25 andere actieve stoffen zoals biologisch actieve of farmaceutisch actieve stoffen, waaronder vitaminen, waarvan de stabiliteit in het geding kan komen bij de verwerking van de actieve stof tot een geschikte toedieningsvorm, zoals een tablet. Tevens is het een doel van de uitvinding  
30 dat de beoogde hulpstof bijdraagt aan het vergroten van de biologische beschikbaarheid van een actieve stof die samen met de hulpstof aanwezig is in een toedieningsvorm.

Bekende stabilisatoren die farmaca tijdens de droogprocedure beschermen, zijn suikers. Suikers beschermen  
35 het farmacon omdat de hydroxylgroepen van suikers de watermoleculen vervangen die waterstofbruggen vormen met de

farmaca. Dit wordt ook wel de "water replacement theory" genoemd. Er wordt dus als het ware een coating van suikermoleculen om het farmacon aangebracht die het farmacon tijdens drogen tegen schadelijke invloeden  
5 beschermt.

In droge vorm biedt een suikercoating het farmacon tevens bescherming indien het suiker zich in de glastoestand bevindt. In de glastoestand zijn de moleculen min of meer willekeurig ten opzichte van elkaar  
10 georiënteerd en is de mobiliteit van de moleculen zeer laag. Vanwege de willekeurige oriëntatie spreekt men in plaats van de glastoestand ook wel van de amorfe toestand. Doordat de oriëntatie van de suikermoleculen min of meer willekeurig is, blijven de interacties van de  
15 hydroxylgroepen van het suiker en het farmacon intact en blijft de bescherming daardoor behouden. De lage mobiliteit van de suikermoleculen is van groot belang aangezien hierdoor ook de mobiliteit van het farmacon zeer laag is. Als gevolg daarvan worden eventuele degeneratieve processen  
20 sterk vertraagt.

Als tijdens de droogprocedure het suiker kristalliseert, gaat de beschermende werking verloren. Tijdens kristallisatie vindt namelijk fasescheiding plaats tussen het suiker en het farmacon en worden de interacties  
25 tussen suiker en het farmacon verbroken. Niet alleen valt hiermee de bescherming weg, ook kan het farmacon beschadigd raken tijdens het fasescheidingsproces zelf.

Er worden dus speciale eisen gesteld aan de droogprocedure om kristallisatie te voorkomen. In de  
30 literatuur worden veelal kleine suikers beschreven voor de toepassing als suikerglas. Kleine moleculen kristalliseren doorgaans echter veel sneller dan grote.

Volgens de onderhavige uitvinding wordt nu een specifiek fructan toegepast voor het vormen van een  
35 suikerglas rond een actieve stof, zoals een farmacon. Gevonden is dat een fructan met een aantalsgemiddelde

polymerisatiegraad van ten minste 6 een bijzonder goede stabiliserende werking heeft en tevens de biologische beschikbaarheid van de actieve stof waarmee het in een toedieningsvorm is verwerkt positief beïnvloedt.

5 Overigens zij opgemerkt dat uit de internationale octrooiaanvraag 96/05809 bekend is dat bepaalde suikers geschikt zijn voor het stabiliseren van een farmacon. De publicatie beschrijft een methode voor het stabiliseren van biologisch actieve stoffen, zoals eiwitten, waarbij een  
10 waterige suspensie of oplossing van een suiker en de biologisch actieve stof wordt gedroogd door bijvoorbeeld vriesdrogen, sproeidrogen of vacuümdrogen. Als voorbeeld voor geschikte suikers worden diverse stoffen genoemd, waaronder inuline als enig fructan. Er worden echter geen  
15 herkomst of eigenschappen van het gebruikte inuline vermeld. Veel commercieel verkrijgbare inulines hebben een aantalsgemiddelde polymerisatiegraad van minder dan 6. Uit de beschreven experimenten blijkt dat het onderzochte inuline niet in staat is om het restrictie-enzym *PstI*  
20 gedurende 7 dagen bij 37°C actief te houden.

De Europese octrooiaanvraag 0 383 569 beschrijft dat op zich instabiele materialen stabiel gehouden kunnen worden met behulp van een dragermateriaal dat oplosbaar of  
25 zwelbaar is in water en dat verkeert in een glasachtige of rubberachtige toestand. Ofschoon dit dragermateriaal een suiker kan zijn, wordt de voorkeur gegeven aan synthetische polymeren zoals polyvinylpyrrolidon, polyacrylamide of polyethyleenimine. In voorbeeld 13 van het document wordt het gebruik van een gevacuümdroogd inuline voor het  
30 stabiliseren van het enzym lactaat dehydrogenase beschreven. Onduidelijk is wat de aantalsgemiddelde polymerisatiegraad van dit inuline is. Opvallend is voorts dat de condities gedurende de opslag van de beschreven monsters dermate ideaal zijn, dat zelfs zonder  
35 dragermateriaal nauwelijks destabilisatie te verwachten zou zijn. De monsters werden bewaard bij 25°C en lage

luchtvochtigheid. Het is evenzeer opvallend dat de beschreven experimenten geen blancotest, dat wil zeggen een test van het enzym zonder dragermateriaal, omvatten.

Volgens de uitvinding wordt onder de term farmacon een biologisch of farmaceutisch actieve stof verstaan. De stof is in staat een biologisch effect te bewerkstelligen. Het farmacon kan van natuurlijke oorsprong zijn, maar kan ook op synthetische of semi-synthetische wijze bereid zijn. Hierbij wordt opgemerkt dat intermediären van een dergelijke bereiding eveneens onder het begrip farmacon vallen. Voorbeelden van farmaca zijn cellen, virussen, plasmiden, nucleïnezuuren zoals DNA en RNA, nucleotiden, oligosacchariden, eiwitten en peptiden, aminozuren, vitamines, lipiden, hormonen, enzymen, groeifactoren, antilichamen, en antigenen. Metaboliëten van de genoemde stoffen, dat wil zeggen stoffen die *in vivo* worden gevormd door een organisme na toediening van één of meer van de gevormde stoffen, worden eveneens door de term farmacon omvat. De uitvinding is in het bijzonder van toepassing op de stabilisatie van peptiden en eiwitten.

Onder een fructan wordt elk oligo- of polysaccharide verstaan dat een veelvoud aan anhydrofructan-eenheden bevat. De fructanen kunnen een polydisperse ketenlengteverdeling hebben, en kunnen een rechte of vertakte keten hebben. Vertakte fructanen worden dikwijls aangeduid als glucanen. Deze stoffen worden in de context van de onderhavige uitvinding eveneens onder de term fructanen begrepen.

Bij voorkeur bevatten de fructanen voornamelijk  $\beta$ -1,2 bindingen, zoals in inuline, maar ze kunnen ook  $\beta$ -2,6 bindingen bevatten, zoals in levan. Geschikte fructanen kunnen direct afkomstig zijn van een natuurlijke bron, maar kunnen ook een modificatie hebben ondergaan. Voorbeelden van modificaties in dit verband zijn op zich bekende reacties die leiden tot een verlenging of verkorting van de ketenlengte.

Een belangrijke parameter van volgens de uitvinding geschikte fructanen is de gemiddelde ketenlengte (aantalsgemiddelde polymerisatiegraad,  $DP_n$ ). Deze dient ten minste 6 te zijn en zal doorgaans niet groter zijn dan ongeveer 1000. Bij voorkeur wordt een fructan gebruikt met een  $DP_n$  van ten minste 7, liever ten minste 10, nog liever ten minste 14, tot ongeveer 60. De  $DP_n$  kan volgens de uitvinding worden bepaald met behulp van High Pressure Liquid Chromatography (anion exchange HPLC).

Fructanen die geschikt zijn volgens de uitvinding zijn, behalve natuurlijk voorkomende polysacchariden, tevens industrieel bereide polysacchariden, zoals hydrolyseproducten, die verkorte ketens hebben, en gefractioneerde producten met een gewijzigde ketenlengte, in het bijzonder met een  $DP_n$  van ten minste 6. Een hydrolysereactie ter verkrijging van een fructan met een kortere ketenlengte kan enzymatisch (bijvoorbeeld met endo-inulinase), chemisch (bijvoorbeeld met waterig zuur), fysisch (bijvoorbeeld thermisch) of door toepassing van heterogene katalyse (bijvoorbeeld met een zure ionenwisselaar) worden uitgevoerd. Fractionering van fructanen, zoals inuline, kan onder andere worden bereikt door kristallisatie bij lage temperatuur, scheiding met kolomchromatografie, membraanfiltratie, en selectieve precipitatie met een alcohol. Andere fructanen, zoals fructanen met een lange keten, kunnen bijvoorbeeld worden verkregen door kristallisatie, uit fructanen waaruit mono- en disacchariden zijn verwijderd, en fructanen waarvan de ketenlengte enzymatisch is verlengd kunnen eveneens dienen als fructan dat wordt toegepast in de onderhavige uitvinding. Voorts kunnen gereduceerde fructanen worden toegepast. Dit zijn fructanen waarvan de reducerende eindgroepen, doorgaans fructosegroepen, zijn gereduceerd, bijvoorbeeld met natriumboorhydride of waterstof in aanwezigheid van een overgangsmetaalkatalysator. Ook fructanen die chemisch zijn gemodificeerd, zoals verknoopte



fructanen en gehydroxyalkyleerde fructanen kunnen worden gebruikt.

In een voorkeursuitvoeringsvorm is het fructan dat volgens de uitvinding wordt toegepast inuline. Inuline is  
5 een polysaccharide, bestaande uit  $\beta$ -1,2 gebonden fructose-eenheden met een  $\alpha$ -D-glucopyranose-eenheid aan het reducerende einde van het molecuul. De stof komt onder meer voor in de wortels en knollen van planten van de *Liliaceae*- en *Compositae*-families. De belangrijkste bronnen voor de  
10 productie van inuline zijn de Jeruzalem-artisjok, de dahlia en de cichoreiwortel. In de industriële productie van inuline gaat men voornamelijk uit van de cichoreiwortel. Het voornaamste verschil tussen inuline afkomstig van de verschillende natuurlijke bronnen zit in de  
15 polymerisatiegraad. Deze kan uiteenlopen van ongeveer 6 bij Jeruzalem-artisjokken, tot 10-14 bij cichoreiwortels en hoger dan 20 bij de dahlia.

Inuline is een oligosaccharide dat, in amorfe toestand, gunstige fysisch-chemische eigenschappen heeft  
20 voor de toepassing als hulpstof voor farmaceutische toedieningsvormen. Deze fysisch-chemische eigenschappen zijn: (instelbare) hoge glasovergangstemperatuur, geringe hygroscopiciteit, geen (reducerende) aldehyde groepen en waarschijnlijk een lage kristallisatiesnelheid. Daarnaast  
25 is inuline niet toxisch en niet duur.

Wanneer een oplossing van inuline wordt gedroogd, bijvoorbeeld door vriesdrogen, vacuümdrogen of sproeidrogen, kan amorf inuline worden verkregen. Gevonden is dat als tevens een farmacon in de oplossing aanwezig is,  
30 deze tijdens drogen door inuline beschermd wordt tegen schadelijke invloeden en dat na het droogproces het farmacon omgeven is door een beschermende coating van amorf inuline. Hierdoor zal de shelf-life van instabiele farmaca, zoals therapeutische eiwitten en peptiden, aanzienlijk  
35 verlengd kunnen worden. Daarnaast zou met een dergelijke

coating de biologische beschikbaarheid van slecht oplosbare  
farmaca aanzienlijk verhoogd kunnen worden.

Geconcludeerd kan worden dat amorf inuline zeer  
interessant is als hulpstof voor preparaten voor pulmonale  
5 toediening, orale toediening, parenterale toediening,  
zetpillen, klysma's en dermatica.

Hieronder wordt de uitvinding nader toegelicht onder  
verwijzing naar het fructan inuline. Dit dient niet als  
beperkend voor de uitvinding te worden opgevat.

10 Zoals hierboven vermeld, kunnen slecht oplosbare  
farmaca een lage biologische beschikbaarheid hebben,  
wanneer deze zijn verwerkt in tabletten voor bijvoorbeeld  
orale of rectale toediening. Als een dergelijk farmacon  
ingesloten is in een inulineglas, dan is elk  
15 farmaconmolecuul voorzien van een coating van amorf  
inuline. Met andere woorden, het farmacon bevindt zich in  
een monomoleculaire vorm. Aangezien amorf inuline snel  
oplost, zal ook de oplossnelheid van het ingesloten  
farmacon sterk verhoogd worden. Hierdoor zal ook de  
20 opnamesnelheid verhoogd worden en daarmee de biologische  
beschikbaarheid.

Ook in andere toedieningsvormen kan de hoge  
oplossnelheid voordelen hebben. Bijvoorbeeld bij pulmonale  
toediening, als er een zeer snelle opname is gewenst.

25 Wanneer gesmolten suiker langzaam wordt afgekoeld  
vindt bij een bepaalde temperatuur kristallisatie plaats.  
Wordt daarentegen gesmolten suiker snel afgekoeld dan wordt  
de glasovergangstemperatuur ( $T_g$ ) gepasseerd. De  $T_g$  is  
altijd lager dan de kristallisatie- of smelttemperatuur. De  
30 glasovergang wordt gekarakteriseerd door een sterke  
verlaging van de mobiliteit van de moleculen terwijl de  
oriëntatie van de moleculen ongewijzigd blijft. De  
kristalstructuur is thermodynamisch stabiel dan de  
glastoestand. Echter de mobiliteit van de moleculen in glas  
35 is zo laag dat kristallisatie zo langzaam verloopt dat dit  
niet meetbaar is. Wordt echter de temperatuur verhoogd tot

boven de Tg maar onder de smelttemperatuur, dan is de mobiliteit van de moleculen zodanig dat kristallisatie vrij snel kan plaatsvinden.

Het is dus van groot belang dat de temperatuur van een farmacon opgeslagen in een suikerglas lager moet zijn dat de Tg teneinde kristallisatie van suiker te voorkomen en daarmee de beschermende werking te behouden. Nu is de Tg van een suiker doorgaans hoger dan kamertemperatuur. Zoals gezegd worden in de literatuur met name kleine suikers, zoals sucrose, trehalose en mannitol als materiaal voor suikerglazen genoemd. Vanwege de hoge Tg (ca 120°C) komt trehalose hierbij in veel wetenschappelijke publicaties als een veelbelovende kandidaat naar voren (de meeste suikers hebben een lagere Tg). De Tg van fructanen, in het bijzonder van inuline, neemt toe naarmate het molecuulgewicht toeneemt zodat, binnen bepaalde grenzen, de Tg ingesteld kan worden. In experimenten werden waarden van 140 en 155°C gevonden voor inulines met een aantalsgemiddelde / gewichtsgemiddeld polymerisatiegraad ( $DP_n/DP_w$ ) van respectievelijk 14,2/19,4 en 23,0/26,2. Met andere woorden, de Tg's van sommige inulines liggen duidelijk hoger dan die van trehalose. Hieruit blijkt dat inulines zeer veelbelovend zijn voor de vorming van een suikerglas ter stabilisatie van actieve stoffen, zoals farmaca.

In de praktijk zal een suikerglas nooit volledig watervrij zijn. Dit is bijvoorbeeld het gevolg van opname van water uit de lucht. Opname van water heeft een fors effect op de Tg: de Tg wordt sterk verlaagd naar mate meer water wordt opgenomen. De mate van wateropname hangt van de hygroscopiciteit van het materiaal en van de relatieve luchtvochtigheidsgraad. Gevonden werd dat trehaloseglas dat bij 20°C werd blootgesteld aan een relatieve luchtvochtigheidsgraad van 45% eerst vervloeiide (de Tg wordt dus lager dan 20°C) en daarna kristalliseerde. Glazen vervaardigd van inuline met een  $DP_n/DP_w$  van 14,2/19,4

daarentegen konden wel onder deze condities worden opgeslagen zonder dat er vloeï werd waargenomen. Inulineglazen met een  $DP_n/DP_w$  van 23,0/26,2 die werden weggezet bij 20°C bleven bij een relatieve

5 luchtvochtigheidsgraad van maar liefst 60% nog intact.

Hieruit kan geconcludeerd worden dat inulineglazen bij een veel hogere relatieve luchtvochtigheidsgraad kunnen worden opgeslagen dan trehalose zonder dat de  $T_g$  wordt gepasseerd.

10 Voor de vorming van een suikerglas op basis van een fructan kan op verschillende manieren te werk worden gegaan.

Bij vriesdrogen wordt een oplossing snel gekoeld zodat alleen kristallisatie van water (ijsvorming) plaatsvindt. Tijdens dit proces wordt de resterende  
15 oplossing steeds geconcentreerder. Dit proces wordt ook wel "freeze-concentration" genoemd. Op een gegeven moment passeert de geconcentreerde oplossing de glasovergangstemperatuur. Deze wordt ook wel de  $T_g'$  genoemd. Er wordt  
20 dus een glas gevormd bestaande uit deels suiker en deels water. Vervolgens wordt de druk gereduceerd waardoor eerst het water uit de ijskristallen sublimeert en daarna water uit het glas. Hierdoor wordt een poreuze cake bestaande uit een suikerglas verkregen. Een poreuze cake is gewenst omdat  
25 deze snel te reconstitueren is.

Vriesdrogen kan op twee manieren fout gaan. Ten eerste: wanneer de oplossing te langzaam wordt gekoeld kristalliseert behalve water ook het suiker uit. Wanneer een instabiel farmacon aanwezig is, gaat hierdoor de  
30 beschermende werking verloren. Ten tweede: wanneer sublimatie plaatsvindt bij een temperatuur hoger dan de  $T_g'$  dan wordt er geen glas gevormd. Na de sublimatie van water uit de ijskristallen vindt verdamping van water (geen sublimatie!) uit de "freeze concentrated" oplossing plaats.  
35 Hierdoor stort de cake als het ware in ("collapse") en kan alsnog kristallisatie van het suiker plaatsvinden.

Dit laatste werd in experimenten getest met trehalose en inuline. Gevriesdroogd werd bij een monstertemperatuur van  $-16^{\circ}\text{C}$ . Bij trehalose werd een collapsed cake gevonden terwijl bij inuline  $\text{DP}_n/\text{DP}_w$  van 14,2/19,4 een fraaie poreuze cake werd gevormd. Hieruit blijkt dat de  $T_g$  van trehalose duidelijk lager ligt dan voor inuline  $\text{DP}_n/\text{DP}_w$  van 14,2/19,4. Inuline kan dus onder minder stringente condities worden gevriesdroogd.

Bij vacuümdrogen wordt de druk boven een oplossing bij kamertemperatuur verlaagd zodat het water verdampt. Omdat tijdens verdamping warmte aan de omgeving wordt onttrokken moet de temperatuur goed geconditioneerd worden om bevriezing te voorkomen. Daarnaast moet worden voorkomen dat onder invloed van de lage druk de oplossing gaat koken. Wanneer namelijk een eiwit aanwezig is, zal door het toegenomen vloeistof/lucht oppervlak makkelijk denaturatie plaatsvinden. Het grote risico van deze techniek is dat kristallisatie in plaats van glasvorming kan plaatsvinden. Het voordeel van inuline hierbij is dat kristallisatie minder makkelijk plaatsvindt dan bij kleine suikers.

Bij sproeidrogen wordt een oplossing verneveld in een stroom van hete lucht. Door de verdamping van water worden kleine deeltjes gevormd. Deze kunnen een grootte hebben van  $1-5\text{ }\mu\text{m}$  en zijn daarom geschikt voor pulmonale toediening. Bekend is dat trehalose een lastig te sproeidrogen verbinding is. Inuline daarentegen laat zich goed sproeidrogen.

De producten die verkregen worden met de hierboven beschreven technieken, waarin dus een actieve stof is verwerkt in een suikerglas van een fructan, laten zich prima verwerken tot geschikte toedieningsvormen. De vakman zal in staat zijn om op zich bekende vormingstechnieken aan te passen aan de eigenschappen van het suikerglas, voorzover nodig.

Veel suikers zoals glucose en lactose bevatten aldehyde groepen. Deze reducerende groepen kunnen met

aminegroepen van bijvoorbeeld eiwitten en peptiden reageren onder vorming van een Schiffse base. Deze initiële reactie kan leiden tot een cascade van reacties die ook wel bekend staat als de Maillard-browning. De Maillard reactie kan  
5 aanleiding geven tot een ernstige aantasting van de biologische activiteit van het farmacon en is dus zeer ongewenst.

Een belangrijk voordeel van fructanen, en in het bijzonder van inuline, is dat, door de specifieke koppeling  
10 van de monosaccharide-eenheden in de oligosaccharide keten, er geen aldehyde groepen aanwezig zijn en de Maillard-browning dus niet kan plaatsvinden.

Fructanen zouden goed toegepast kunnen worden in een grote variëteit aan toedieningsvormen. Bij sproeidrogen  
15 kunnen sferische deeltjes met een diameter van 1-5  $\mu\text{m}$  worden verkregen. Deze deeltjesgrootte is ideaal voor poeders voor pulmonale toediening. Door een oplossing van inuline en een farmacon te sproeidrogen kan dus een toedieningsvorm voor de longen worden ontwikkeld. Voorts  
20 kan ook gedacht worden aan de verwerking van inulineglazen, waarin farmacon zijn opgesloten, in preparaten voor orale, pulmonale en parenterale toediening. Geschikte voorbeelden zijn onder meer zetpillen, klysma's, tabletten, capsules, lozenges, dermatica en suspensies voor subcutane of  
25 intramusculaire injecties.

Fructanen, en met name inuline, vormen non-toxische producten en worden in de Farmacopee genoemd. In de huidige klinische praktijk worden fructanen reeds toegepast, onder meer als tracer materiaal om de efficiëntie van de nieren  
30 van patiënten te testen. Problemen bij de acceptatie van amorf inuline als hulpstof voor farmaceutische toedieningsvormen zijn, vanuit toxicologisch oogpunt, dan ook niet te verwachten.

De uitvinding wordt thans nader toegelicht aan de  
35 hand van de volgende voorbeelden.

VOORBEELD IBepaling molecuulgewicht

Het molecuulgewicht uitgedrukt in aantalsgemiddelde  
5 polymerisatiegraad ( $DP_n$ ) en gewichtsgemiddelde  
polymerisatiegraad ( $DP_w$ ) werd bepaald met behulp van anion  
exchange HPLC. Hierbij werd een CarboPac PA1 (4x250 mm)  
kolom en een CarboPac PA (4x50 mm) voorkolom gebruikt.  
Geëlueerd werd met een 60 min lineaire gradiënt met een  
10 mengsel van oplossingen van natriumhydroxide en natrium  
acetaat in water waarvan de verhouding werd gevarieerd van  
0,10:0,025 mol/L tot 0,10:0,40 mol/L. Het systeem (DIONEX)  
was voorzien van een Pulsed Electrochemical Detector. Het  
toegepaste voltage van de puls was 0,1; 0,6 en 0,6 V  
15 gedurende respectievelijk 0,5; 0,1 en 0,05 sec. Het signaal  
werd geïntegreerd tussen 0,3 en 0,5 sec na het begin van de  
puls. Het systeem werd gekalibreerd met oplossingen van  
oligomeren met bekende ketenlengtes en concentraties.

20 Bereiding gevriesdroogde monsters

Alkalische fosfatase met en zonder stabilisator werd  
opgelost in een 0,05 M 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol  
oplossing in water, pH 9,8. De concentratie alkalische  
fosfatase was in alle gevallen 2,5 mg/mL. Als stabilisator  
25 werd gebruikt: inuline SC 95, inuline RS en inuline EXL  
608. Trehalose en glucose werden gebruikt als  
respectievelijk positieve en negatieve controle. De  
gewichtsverhouding alkalische fosfatase/stabilisator was in  
alle gevallen 1/9. Van de oplossingen werd 2 mL  
30 overgebracht in glazen monstervaatjes met een diameter van  
circa 2 cm. De monstervaatjes werden overgebracht in  
vloeibare stikstof. Nadat de oplossing volledig was  
bevroren, werden de monstervaatjes overgebracht in een  
Christ vriesdroger, model Alpha 2-4 bij een  
35 plaattemperatuur van  $-30^{\circ}\text{C}$ . Vervolgens werd gevriesdroogd  
bij een condensor temperatuur van  $-53^{\circ}\text{C}$  en een druk van

0,220 mbar gedurende 18 uur. Vervolgens werd gedurende 6 uur de plaattemperatuur en de druk geleidelijk aan verhoogd tot respectievelijk 20°C en 0,520 mbar. Vervolgens het vriesdroogproces gedurende nog eens 20 uur gecontinueerd.

5

#### Conditionering

Twee series experimenten werden uitgevoerd. In de eerste serie werden de monsters gedurende 6 dagen bij 0% relatieve vochtigheidsgraad (RH) en 60°C weggezet waarna de activiteit van het eiwit werd bepaald. In de tweede serie experimenten werden de monsters in een exsiccator boven silicagel (0% RH) of in klimaatkasten (45% en 60% RH) bij 20°C weggezet. Op verschillende tijdstippen werd de activiteit van het eiwit bepaald.

15

#### Bepaling activiteit alkalische fosfatase.

De activiteit van alkalische fosfatase werd als volgt bepaald. De gevriesdroogde monsters werden gereconstitueerd met water. Aan 50 µL van de verkregen oplossing werd toegevoegd 905 µL van een 0,05 M 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol oplossing in water, pH 9,8 en 20 µL van een 100 mM MgCl<sub>2</sub> oplossing in water. Vervolgens werd 50 µL van een vers bereide oplossing van 10 mg fosfatase substraat (para-nitrophenylfosfaat) per mL water toegevoegd. Het mengsel werd gevortexed en vervolgens geïncubeerd bij 37°C. Na 30 minuten werd de reactie stopgezet door toevoeging van 5,0 mL van een 0,1 N oplossing van NaOH in water. De extinctie van de verkregen oplossing werd gemeten bij 405 nm. Een ijklijn werd gemaakt met behulp van vers bereide oplossingen van alkalische fosfatase in 0,05 M 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol in water, pH 9,8 met bekende concentraties.

35

#### Resultaten

Zoals in Tabel I is te zien leidde het vriesdrogen van een alkalische fosfatase oplossing tot een dramatische



afname van de activiteit. Wanneer drie verschillende inulines alsmede de positieve en negatieve controle worden toegepast als stabilisator, dan vond er echter geen significante afname van de activiteit plaats.

5           Na 6 dagen opslag van de gevriesdroogde inuline SC 95, trehalose en glucose houdende monsters bij 0% RH en 60°C was de activiteit van het eiwit volledig verdwenen (zie Tabel I). De activiteit van alkalische fosfatase van de inuline RS en inuline EXL 608 was na 6 dagen onder deze  
10       condities daarentegen nog substantieel (zie Tabel I).

          Na 4 weken opslag van alle gevriesdroogde suikerhoudende monsters bij 0% RH en 20°C bleef de activiteit van het eiwit volledig behouden. Figuur I toont de activiteit alkalische fosfatase van gevriesdroogde  
15       monsters na opslag bij 0% RH en 20°C als functie van de opslagtijd. Data zijn gemiddelden van 2 onafhankelijke experimenten.

          Dit geldt ook voor de inuline RS, inuline EXL 608 en trehalose houdende monsters die gedurende 4 weken bij 45%  
20       en 60% RH werden weggezet (zie Figuur II en III).

          Figuur II toont de activiteit alkalische fosfatase van gevriesdroogde monsters na opslag bij 45% RH en 20°C als functie van de opslagtijd. Data zijn gemiddelden van 2 onafhankelijke experimenten.

25           Figuur III toont de activiteit alkalische fosfatase van gevriesdroogde monsters na opslag bij 60% RH en 20°C als functie van de opslagtijd. Data zijn gemiddelden van 2 onafhankelijke experimenten.

          Opslag van de inuline SC 95 en glucose houdende  
30       monsters onder deze condities leidde echter tot een substantiële afname van de activiteit. Bij 45% RH nam de activiteit gedurende 4 weken geleidelijk af tot  $72,3 \pm 0,1\%$  en  $57,9 \pm 3,1\%$  voor respectievelijk inuline SC 95 en glucose. Bij 60% RH was na vier weken de activiteit  $38,8 \pm 6,5\%$  en  $46,3 \pm 16,1\%$  voor respectievelijk inuline SC 95 en  
35       glucose.

Tabel I

	DP <sub>n</sub> /DP <sub>w</sub> <sup>a,b</sup>	Activiteit alkaline fosfatase direct na vriesdrogen (%) <sup>c</sup>	Activiteit alkaline fosfatase na vriesdrogen en 6 dagen bij 0% RH en 60°C (%) <sup>d</sup>
Inuline EXL608	23,0/26,2	95,0 ± 2,5	50,9 ± 15,3
Inuline RS	14,2/19,4	94,4 ± 10,6	42,8 ± 10,8
Inuline SC 95	5,5/6,0	110,0 ± 2,4	-1,4 ± 1,6
Trehalose	-	95,9 ± 11,5	-1,4 ± 2,8
Glucose	-	110,3 ± 10,6	0,8 ± 4,5
Geen stabilisator	-	5,4 ± 2,1	-0,7 ± 0,8

a) DP<sub>n</sub>: aantalsgemiddelde polymerisatiegraad;  
DP<sub>w</sub>: gewichtsgemiddelde polymerisatiegraad

5 b) De polymerisatiegraad werd bepaald met behulp van anion  
exchange HPLC.

c) Gemiddelde van 2 onafhankelijke experimenten

d) Gemiddelde van 4 onafhankelijke experimenten

10

### Voorbeeld II

Een oplossing van 9,0 wt% inuline RS (DP<sub>n</sub> = 14,2;  
DP<sub>w</sub> = 19,4) en 1,0 wt% alkalische fosfatase werd bereid in  
15 0,05 M 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol (Ammediol) pH 9,8.  
De oplossing werd gesproeidroogd met een Büchi 190  
minisproeidroger. De oplossing werd verpompt met een  
snelheid van 5 mL/min en verneveld met een luchtstroom van  
600 L/uur. De nevel werd gedroogd met een luchtstroom van  
20 600 L/min en een inlaattemperatuur van 120-150°C. Deze  
condities leidden tot een uitlaattemperatuur van 50-80°C.  
Het product, een zeer fijn wit poeder, werd opgeslagen in  
een exsiccator boven silicagel.

## CONCLUSIES

1. Stabilisator voor een actieve stof, zoals een farmacon, omvattende een fructan met een aantalsgemiddelde polymerisatiegraad van ten minste 6 in de vorm van een suikerglas.
- 5 2. Stabilisator volgens conclusie 1, waarbij het fructan een aantalsgemiddelde polymerisatiegraad heeft van ten minste 10.
3. Stabilisator volgens conclusie 1 of 2, waarbij het fructan inuline is.
- 10 4. Werkwijze voor het stabiliseren van een actieve stof, zoals een farmacon, waarbij het farmacon wordt opgenomen in een suikerglas van een fructan met een aantalsgemiddelde polymerisatiegraad van ten minste 6.
5. Werkwijze volgens conclusie 4, waarbij het fructan
- 15 een aantalsgemiddelde polymerisatiegraad heeft van ten minste 10.
6. Werkwijze volgens conclusie 4 of 5, waarbij het fructan inuline is.
7. Werkwijze volgens conclusies 4-6, waarbij het
- 20 suikerglas wordt gevormd door sproeidrogen, vacuümdrogen of vriesdrogen.
8. Gestabiliseerde actieve stof, zoals een farmacon, verkrijgbaar middels een werkwijze volgens conclusies 4-7.
9. Farmaceutisch preparaat omvattende een
- 25 gestabiliseerde actieve stof volgens conclusie 8.
10. Farmaceutisch preparaat volgens conclusie 9 in de vorm van een tablet, capsule, lozenge, dermaticum, zetpil, poeder voor pulmonale toediening, of een staafje of suspensie voor subcutane of intramusculaire toediening.
- 30 11. Toepassing van een suikerglas van een fructan met een aantalsgemiddelde polymerisatiegraad van ten minste 6 voor het verhogen van de biologische beschikbaarheid van een actieve stof, zoals een farmacon.

12. Toepassing van een suikerglas van een fructan met een aantalsgemiddelde polymerisatiegraad van ten minste 6 voor het stabiliseren van een actieve stof, zoals een farmacon.

UITTREKSEL

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een hulpstof voor een actieve stof, zoals een farmacon. De hulpstof heeft een stabiliserende werking. De hulpstof heeft verder een positieve invloed op de biologische beschikbaarheid van de actieve stof waarmee de hulpstof in een farmaceutisch preparaat kan worden verwerkt. De hulpstof is gebaseerd op een fructan met een aantalsgemiddelde polymerisatiegraad van ten minste 6 en wordt toegepast in de vorm van een suikerglas.

Figure I

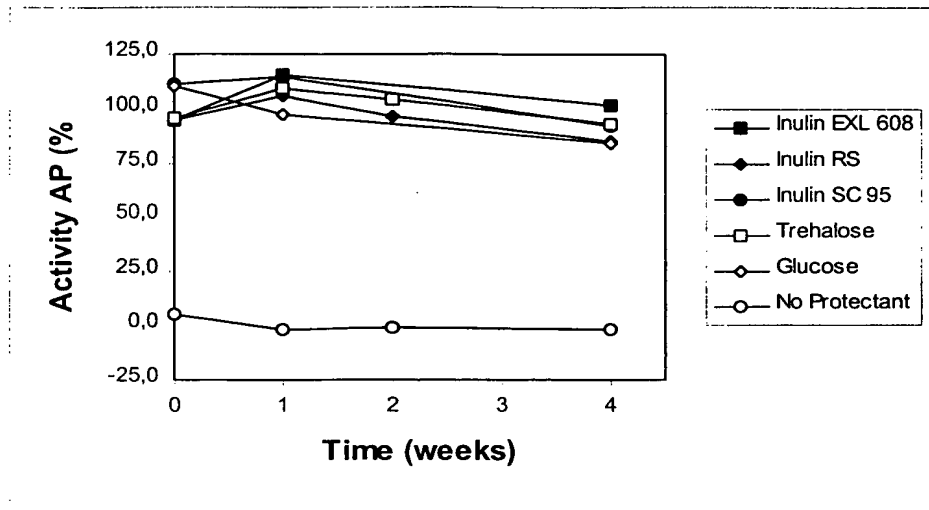


Figure II

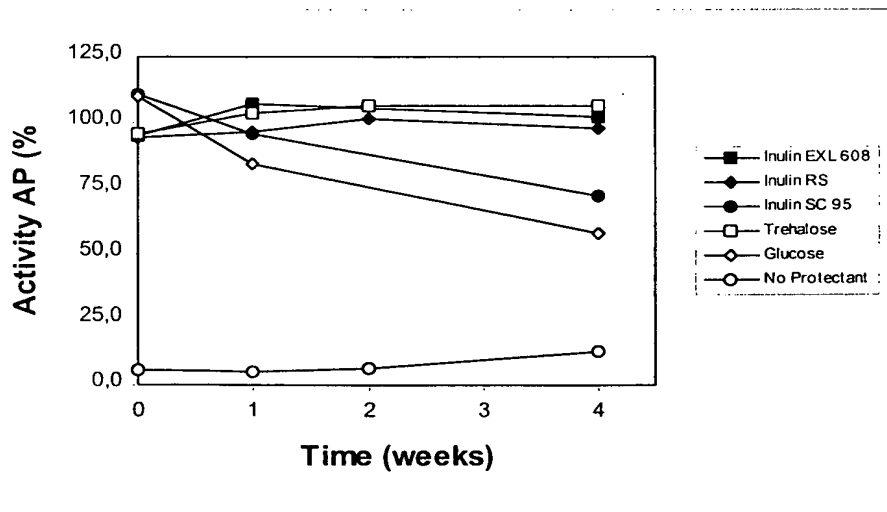


Figure III

